

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22620111151424

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**东海微微型绿藻和定鞭金藻的多样性
及分布研究**

**Study on the diversity and distribution of
the pico-Chlorophyta and the pico-Haptophyta
in the East China Sea**

廖 渝

指导教师姓名: 黄邦钦 教授

专 业 名 称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2014 年 5 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

2014年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	I
Abstract.....	III
缩略词表	V
第一章 绪论	1
1.1 海洋微微型真核浮游植物的研究现状	1
1.2 研究海区概况	12
1.3 本论文的科学问题和研究内容	13
第二章 材料与方法	15
2.1 东海微微型绿藻和定鞭金藻的遗传多样性	15
2.2 东海微微型真核浮游植物主要类群的时空分布	21
第三章 东海微微型绿藻和定鞭金藻的遗传多样性.....	25
3.1 各研究站位的理化参数	25
3.2 东海微微型绿藻的遗传多样性	26
3.3 东海微微型定鞭金藻的遗传多样性	37
3.4 讨论	49
3.5 小结	53
第四章 东海微微型真核浮游植物主要类群的时空分布.....	54
4.1 秋季航次	54
4.2 春季航次	64
4.3 讨论	68
4.4 小结	70
总结与展望	72
参考文献	77

附录.....88

致谢.....89

Contents

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English).....	III
Abbreviations	V
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Research progress of the marine photosynthetic picoeukaryotes	1
1.2 Background of the research area	12
1.3 Objectives and contents of this study	13
Chapter 2 Materials and methods.....	15
2.1 Genetic diversity of the pico-Chlorophyta and the pico-Haptophyta in the East China Sea	15
2.2 Temporal and spatial variation of the major PPE components in the East China Sea ..	21
Chapter 3 Genetic diversity of the pico-Chlorophyta and the pico-Haptophyta in the East China Sea.....	25
3.1 Environmental parameters.....	25
3.2 Genetic diversity of the pico-Chlorophyta in the East China Sea	26
3.3 Genetic diversity of the pico-Haptophyta in the East China Sea.....	37
3.4 Discussion	49
3.5 Conclusion.....	53
Chapter 4 Temporal and spatial variation of the major PPE components in the East China Sea	54
4.1 Autumn cruise	54
4.2 Spring cruise.....	64

4.3 Discussion	68
4.4 Conclusion.....	70
Summary and prospect	72
Reference	77
Appendix.....	88
Acknowledgement.....	89

摘 要

微微型绿藻和定鞭金藻是海洋生态系统中重要的初级生产者,在物质循环和能量流动过程中起重要作用,但目前对于微微型绿藻和定鞭金藻的多样性及分布的研究较少。本研究以东海为主要研究海区,以分子生物学的手段,包括 18S rRNA 克隆文库和荧光原位杂交结合酪酰胺信号放大 (fluorescence *in situ* hybridization associated with tyramide signal amplification, FISH-TSA) 技术来研究东海微微型绿藻和定鞭金藻的多样性及微微型真核浮游植物主要类群的时空分布特征,主要结果如下:

(1) 构建了基于东海及西太平洋黑潮区的 6 个代表性站位共 8 个样品的微微型绿藻和定鞭金藻的 18S rRNA 克隆文库。

东海及西太平洋黑潮区微微型绿藻的多样性十分丰富,检测到 336 条微微型绿藻的序列,分为 35 个操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。微微型绿藻的序列分布在青绿藻 Clade I (Pyramimonadales)、青绿藻 Clade II (Mamiellophyceae)、青绿藻 Clade VII (Prasino-Clade VII)、青绿藻 Clade IX (Prasino-Clade IX) 和共球藻纲 (Trebouxioephyceae) 等 5 个类群。遗传演化分析表明,各类群序列均落入已知的演化分支中。*Micromonas* Clade A 和 *Ostreococcus* Clade B 是东海微微型绿藻的优势类群, *Micromonas* Clade B₄ 的序列只分布在陆架区的文库中, *Ostreococcus* 的一个 OTU 与红海的一条参比序列独立形成一个可能的 *Ostreococcus* 新进化分支。

检测到东海和西太平洋黑潮源区 554 条微微型定鞭金藻序列,分为 58 个 OTU。微微型定鞭金藻的序列主要分布在棕囊藻 (Phaeocystales)、定鞭藻 (Prymnesiales)、定鞭金藻 Clade D (Hapto-Clade D)、定鞭金藻 Clade E (Hapto-Clade E)、合盘藻 (Zygodiscales) 和条结球藻 (Syracosphaerales) 等 6 个类群。遗传演化分析表明,除了已知的演化分支外,本研究也发现了一个定鞭金藻的新演化分支 (Novel Class),该分支的序列均来自西太平洋黑潮区站位的文库中,是一个适应寡营养的演化分支。Hapto-Clade D 是一个被认为主要分布在寡营养海区的类群,而本研究的结果表明 Hapto-Clade D 是一个广泛分布于寡营养、中营养甚至

富营养海区的类群。

(2) 研究了东海秋季和春季微微型真核浮游植物主要类群的时空分布特征。

结果表明,在秋季和春季航次,微微型绿藻和定鞭金藻共同构成了微微型真核浮游植物的主要组成成分,它们在不同环境条件下的丰度可占微微型真核浮游植物总丰度的 44.8-100%。春季航次中微微型浮游植物的最高丰度为 36364 cells mL⁻¹,显著高于秋季航次中的最高丰度 18715 cells mL⁻¹。微微型真核浮游植物各类群在分布上存在明显的季节差异,秋季航次中微微型浮游植物在长江口-陆架-外缘海区呈现斑块状分布;春季航次中微微型浮游植物主要集中在长江口区域,微微型定鞭金藻主要分布在陆架区的表层。

关键词: 青绿藻; 定鞭金藻; 遗传多样性; 时空分布; 18S rRNA; 荧光原位杂交; 东海

Abstract

The Chlorophyta and the Haptophyta are the important primary producers of marine ecosystem, play an important role in the material circulation and energy flow. But the knowledge of their diversity and distribution is very limited. In this study, we used molecular approaches, 18S rRNA clone library and fluorescent *in situ* hybridization associated with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to investigate the diversity of Chlorophyta and Haptophyta and the distributions of major components of the photosynthetic picoeukaryotes in the East China Sea. The main results are as below:

(1) We chose 8 samples from 6 stations in the East China Sea and the source area of the Kuroshio in the West Pacific to construct the 18S rRNA clone libraries for Chlorophyta and Prymnesiophyceae.

The Chlorophyta had a high diversity in all the samples and we got 336 Chlorophyta sequences which could be classified into 35 operational taxonomic unit (OTU). The sequences fall into 5 groups: Pyramimonadales, Mamiellophyceae, Prasino-Clade VII, Prasino-Clade IX and Trebouxiophyceae. The phylogenetic analysis showed the sequences all fall into the known evolutionary branch. The *Micromonas* Clade A and *Ostreococcus* Clade B were the dominate groups of the Chlorophyta in the East China Sea, the *Micromonas* Clade B₄ contain sequences only from stations in the continental shelf. An *Ostreococcus* OTU and a reference sequence from the Red Sea formed a new evolutionary branch, could be a new *Ostreococcus* clade.

We got 554 Prymnesiophyceae sequences which divided into 58 OTU. The sequences fall into 6 groups: Phaeocystales, Prymnesiales, Hapto-Clade D, Hapto-Clade E, Zygodiscales and Syracosphaerales. Phylogenetic analysis showed the sequences fall into the known evolutionary branches and a new evolutionary branch. The sequences of this branch all came from the West Pacific libraries suggest this

branch could be a new Haptophyta group that mainly distributed in the oligotrophic waters. The Hapto-Clade D was thought to be widely distributed in the oligotrophic waters, but our results showed the Hapto-Clade D could also existed in the mesotrophic or even the eutrophic waters.

(2) We investigated the temporal and spatial variations of the major components of photosynthetic picoeukaryotes (PPEs) in spring and fall in the East China Sea.

Results suggested the pico-Chlorophyta and the pico-Haptophyta were the major components of the PPEs which account for 44.8-100% of the total cell abundance in the spring and fall cruises. The max abundance of PPEs in the spring cruise was 36364 cells mL⁻¹, significantly higher than that of the fall cruise which was 18715 cells mL⁻¹. In the fall cruise, the PPEs showed a patchy distribution along the estuary-continental shelf-open sea, while it was mainly distributed at the Changjiang estuary area and the pico-Haptophyta mainly distributed at the surface layer of continental shelf in the spring cruise.

Key words: Prasinophyceae; Haptophyta; Genetic Diversity; Temporal and Spatial Variation; 18S rRNA; FISH-TSA; the East China Sea

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
19-BUT	19'-butanoyloxyfucoxanthin	19'-丁酰基氧化岩藻黄素
19-HEX	19'-hexanoyloxyfucoxanthin	19'-己酰基氧化岩藻黄素
CCA	canonical correlation analysis	典型对应分析
CHEMTAX	chemical taxonomic	化学分类法
CTAB	hexadecyl trimethyl ammonium bromide	溴化十六烷基三甲铵
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DNA	deoxyribionucleic acid	脱氧核糖核酸
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization	荧光原位杂交
HPLC	high performance liquid chromatography	高效液相色谱
ML	maximum likelihood	最大似然法
OTU	operational taxonomic unit	操作分类单元
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PPE	photosynthetic picoeukaryote	光合自养的微微型真核浮游植物
rRNA	ribosomal RNA gene	核糖体RNA基因
SSU	ribosomal small subunit	核糖体小亚基
SDS	sodium dodecylsulfate	十二烷基磺酸钠
TSA	tyramide signal amplification	酪氨酸信号放大

第一章 绪论

1.1 海洋微微型真核浮游植物的研究现状

1.1.1 海洋微微型浮游植物

微微型浮游植物 (Picophytoplankton) 是浮游植物的重要组成部分, 在一些寡营养的海区, 特别是在开放大洋, 浮游植物的组成往往被微微型浮游植物所占据。微微型浮游植物的定义是细胞大小小于 3 微米的浮游植物 (Vaulot et al., 2008), 微微型浮游植物的个体微小, 因此具有较大的比表面积, 加强了营养盐的吸收效率, 使得它们在跟其他大型生物竞争的时候更有优势 (Raven, 1986; Raven, 1998)。

微微型浮游植物又主要分为原核和真核两大部分, 原核的部分主要由聚球藻 (*Synechococcus*) 和原绿球藻 (*Prochlorococcus*) 组成, 真核的部分则包括所有能够进行光合自养的微微型真核浮游植物 (photosynthetic picoeukaryotes, PPEs), 包括普林藻 (Prymnesiophyceae), 青绿藻 (Prasinophyceae), 大洋藻 (Pelagophyceae) 等 (Marie, 2010)。研究表明, 尽管在寡营养的开放大洋里原核的微微型浮游植物在数量上占据优势, 但真核的组分同样贡献了非常显著的初级生产力 (Jardillier et al., 2010)。Jardillier 等 (2010) 用流式细胞仪分选出 4 个类群的微微型真核浮游植物 (包括聚球藻, 原绿球藻, Euk A (平均粒径 1.8 微米) 和 Euk B (平均粒径 2.8 微米)) 进行放射性实验, 结果显示原核组分的固碳速率要小于真核组分, 而且 Euk B 虽然丰度最低, 但却贡献了 25% 的初级生产力。同样 Li 等 (1994) 早在 1994 年就发现真核组分贡献的初级生产力跟它们的丰度不成正比。Worden 等 (2004) 在近岸环境中发现真核的组分贡献了高达 75% 的初级生产力。鉴于微微型真核浮游植物 (PPEs) 有如此重要的生态作用, 它们在海洋中的多样性以及分布得到广泛关注。

1.1.2 微微型真核浮游植物多样性的研究方法

多样性的研究是我们了解不同类群在生态系统中的作用的基础, 但微微型真

核浮游植物的多样性研究存在很多限制，因而至今仍然还有很多未知。

显微技术

浮游植物多样性的研究最早是通过显微镜进行，但在开放大洋，浮游植物的进化更加收敛，个体微小，形态也大多趋于球形 (Potter et al., 1997)。同样微型浮游植物由于个体微小，比较脆弱，难以纯化培养，至今也只有大约 70 种的微型真核浮游植物被描述过 (Le Gall et al., 2008; Vaulot et al., 2008)，缺乏显著的形态学分类标准，因而使用显微镜来评估微型浮游植物的多样性受到限制。70 年代末期，荧光显微镜 (epifluorescence microscopy) 被引入海洋微生物的研究，依靠细胞内成分的发射光，例如叶绿素 *a* 的荧光或者被染色的物质，如 DNA，来研究海洋环境中 PPEs 的分布和多样性 (Murphy and Hangen, 1985)。

基于浮游植物光合色素的类群指示

浮游植物光合色素也是一种有效的研究多样性的方法，长期以来，叶绿素 *a* 的浓度被用来估算浮游植物的生物量。高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 的发展使得研究者可以更加精确的测定叶绿素 *a*，同时高效液相色谱可以分离和定量大约 50 种不同的浮游植物光合色素 (Gibb et al., 2000)。这些色素可以作为浮游植物组成和分布的标志，例如 19'-乙酰基氧化岩藻黄素 (19'-hexanoyloxyfucoxanthin, 19-HEX) 可以作为定鞭金藻的特征色素，岩藻黄素 (fucoxanthin, FUCO) 可以作为硅藻的特征色素，青绿藻素 (prasinolaxanthin, PRAS) 可以作为青绿藻的特征色素 (Gibb et al., 2000)。通过这些特征色素结合化学分类法 (chemical taxonomy, CHEMTAX) 算法可以得到不同海区浮游植物的群落组成。目前用 HPLC-CHEMTAX 方法来研究浮游植物的多样性已经被广泛的应用在地中海，印度洋及南海等各个海区 (Brunet et al., 2006; Not et al., 2008; 王磊, 2012)，结果显示定鞭金藻在开放大洋，尤其是寡营养的水体里对初级生产力的贡献显著 (Not et al., 2008)。浮游植物光合色素可以说明一些问题，但是也相应的存在一些问题，例如不同的类群可以共有同一套色素组成，例如硅藻和 Bolidophytes (Guillou et al., 1999)，或者同一个类群可能含有好几种特征色素，例如青绿藻 (Latasa et al., 2004)。

分子生物学技术

显微镜和光合色素的研究只能给出一个粗略的分类,近年来分子生物学的引入和飞速发展使得研究者可以在一个高分辨率的水平下来研究 PPEs 的多样性。研究 PPEs 多样性最常用的分子标志物是小亚基核糖体基因 (SSU rRNA), 这个区域包含了保守区和高变区, 能够在不同分类水平下辨别多样性 (Vaulot et al., 2008)。另外一个优势是, rRNA 的转录产物是核糖体的基本材料, 在细胞中大量存在, 容易被提取扩增。利用引物扩增 18S rRNA 揭示了一个巨大的未知的真核浮游植物的多样性 (Moon-van der staay et al., 2001)。在一些用 18S rRNA 研究近岸水体的研究中, PPEs 的组成被绿藻序列所占据 (Romari and Vaulot, 2004; Not et al., 2007)。更多的研究表明, 包括北冰洋和大西洋的样品, 绿藻是主要的类群, 而定鞭金藻, 硅藻, 甲藻等也是 PPE 的重要组成成分 (Diez et al., 2001)。然而传统的 18S 克隆文库中大量的序列属于异养类群, 例如 Marine Stremnopiles (MAST) (Massana et al., 2004) 和 Alveolata (Guillou et al., 2008), 自养类群序列的稀少限制了对光合自养类群的调查能力 (Marie et al., 2010)。的确, 在被异养序列占据的文库中类群的分布与显微镜的结果形成鲜明的对比, 在显微镜下自养的细胞可以占到真核细胞的 85% (Not et al., 2004)。为了更好的研究光合自养的类群, Shi 等 (2009) 将流式分选技术同克隆文库技术结合起来, 首先以叶绿素 *a* 为指标分选出光合自养的类群, 然后再构建克隆文库。研究表明, 在经过分选后的克隆文库里自养类群的比例可以从 54% 上升到 92% (Marie et al., 2010)。此外, 经过流式分选后的克隆文库中还发现了在膜样上从未发现过的类群 (Shi et al., 2009; Marie et al., 2010)。除此之外, 为了研究特定类群的多样性, 研究者们设计出了一系列的特异性引物。Viprey 等 (2008) 设计出了一对绿藻的特异性引物, 可以很好的扩增绿藻序列, 通过对比研究发现, 文库中绿藻序列的比例可以从传统引物的 4% 提高到 26%。Simon 等 (2013) 设计了一对针对普林藻纲 (Prymnesiophyceae) 的特异性引物, 可以特异性的扩增普林藻序列, 揭示了普林藻丰富的多样性, 尤其是在海水中的多样性。

荧光原位杂交技术

任何生物都具有各自特异性的基因序列, 根据不同生物特征性的靶序列的差

异可以设计出一种单链的寡核苷酸探针,这种探针根据碱基互补配对原则与特定生物的靶序列结合,因而具有高度的专一性(侯建军, 2006)。研究者将荧光染料标记的寡核苷酸探针杂交到细胞上,然后通过荧光显微镜检测杂交位点,从而在保持细胞形态完整的条件下检测细胞内的核酸序列,这便是荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)(Amann and Fuchs, 2008)。FISH 可以不依赖于纯培养,且同时结合了显微镜的可视性和分子生物学的精确性,通过不同的探针可以对不同类群进行定性和定量分析,从而得到样品中微生物的群落结构。

FISH 的基本流程主要包括以下几个步骤(图 1-1): 1) 样品固定; 2) 样品预处理; 3) 探针杂交; 4) 探针洗脱; 5) 检测。

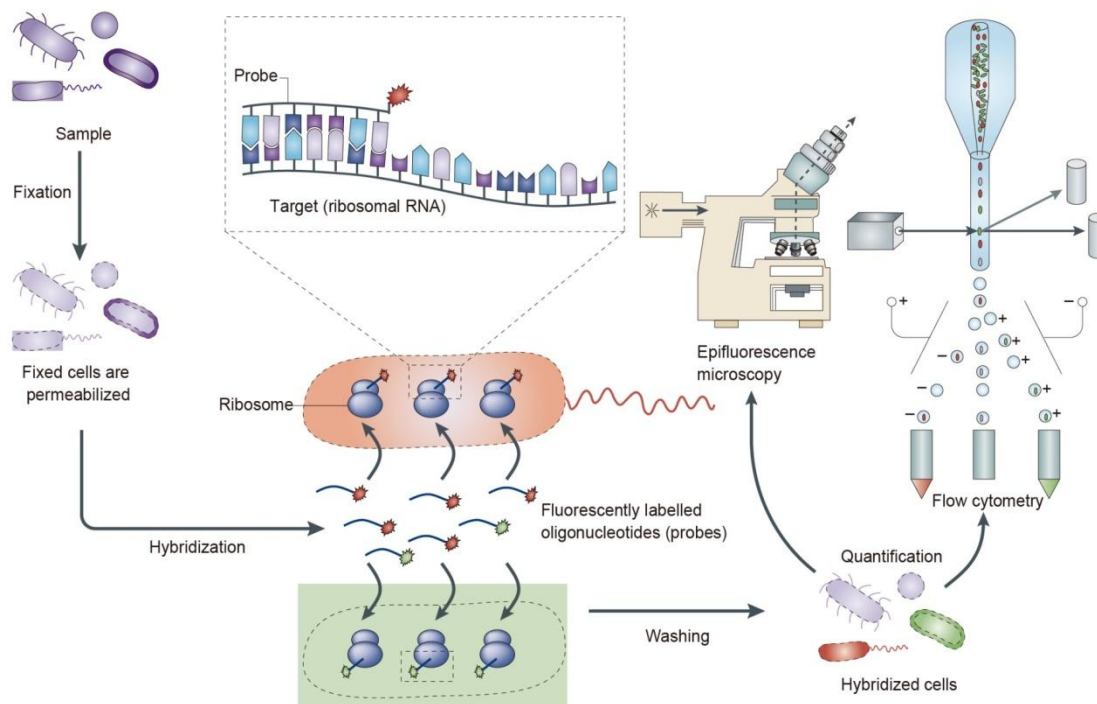


图 1-1 荧光原位杂交技术 (FISH) 的流程图 (Amann and Fuchs, 2008)

Fig. 1-1 Basic steps of fluorescence *in situ* hybridization
(Amann and Fuchs, 2008)

传统的 FISH 探针是单荧光标记的寡核苷酸探针,其检测敏感度有限,为提高其敏感度研究者们尝试了很多方法,例如使用亮度更高的荧光染料 (Alfreider et al., 1996), 使用图像强化的视频显微镜 (Fuhrman and Ouverney, 1998), 或者使

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库